

**Aus der Klinik für Neurochirurgie  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
(Direktor: Prof. Dr. med. H.M. Mehdorn)**

**EXPRESSION DER DNA- MISMATCH- REPARATUR-GENE  
MLH1, MSH2 UND MSH6  
IN INITIALEN GLIOBLASTOMEN UND –REZIDIVEN:  
ASSOZIATION ZU PROLIFERATIONSINDEX  
UND ÜBERLEBEN**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
vorgelegt von

**ALEXANDROS DOUKAS**

aus Athen, Griechenland

Kiel, 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Stark

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. B. N. Kimmig

Tag der mündlichen  
Prüfung: 17.02.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 17.02.2012

gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Kapitel</b>	<b>Seite</b>
<b>1 Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Glioblastom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Histopathologie & Einteilung nach der WHO-Klassifikation	1
1.1.3 Primäre und sekundäre Genese	2
1.1.4 Multizentrische und multifokale Glioblastome	2
1.1.5 Lokalisation, Symptomatik und Diagnostik	3
1.1.6 Operative Behandlung	3
1.1.7 Adjuvante Behandlung	6
1.1.8 Klinischer Verlauf bei Glioblastom-Patienten, Lokalrezidive	6
1.2 Das DNA-Mismatch-Reparatur System (MMR)	7
1.3 Fragestellung	8
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1 Patientenkollektiv	9
2.2 Immunhistochemische Untersuchungen	9
2.2.1 Hematoxylin-Eosin-Färbung	9
2.2.2 Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen MLH1, MSH2 und MSH6	10
2.2.3 Färbung mit MIB-1	10
2.2.4 Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen	11
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>12</b>
3.1 Klinische Charakteristika der 42 Patienten	12
3.2 Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen	12
3.2.1 Expression von MLH1/MSH2/MSH6 in initialen versus Rezidiv-Tumoren	12
3.2.2 Expression von Ki67 in initialen Tumoren und Rezidiven	14
3.2.3 Korrelation zwischen der Expression von MLH1/MSH2/MSH6 und dem Ki-67 Proliferationsindex (Ki67 PI)	14
3.2.4 Korrelation zwischen der MLH1/MSH2/MSH6 Expression und der Überlebenszeit	14

<b>4. Diskussion</b>	<b>17</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>25</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>27</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>35</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>37</b>
<b>Danksagung</b>	

# **1 Einleitung und Fragestellung**

## **1.1 Das Glioblastom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Das Glioblastom ist der häufigste und bösartigste hirneigene Tumor im Erwachsenenalter. Die Inzidenz in Europa und den USA liegt bei ca. 3 pro 100.000 pro Jahr. Es können Patienten in jedem Lebensalter erkranken, am häufigsten sind Personen zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr betroffen. Der Tumor tritt bei Männern 1,2 bis 1,5-mal häufiger auf als bei Frauen [Filippini et al., 2008; Louis et al., 2007; Lutterbach et al., 2003; Stark et al., 2005]. Die Behandlung besteht in der möglichst vollständigen Operation [Stummer et al., 2008] gefolgt von adjuvanter Radio-/Chemotherapie mit Temozolomid (Temodal®) und Temozolomid-Erhaltungstherapie. Das mittlere Überleben beträgt damit bis zu 14,6 Monate [Stupp et al., 2005].

### **1.1.2 Histopathologie & Einteilung nach der WHO-Klassifikation**

Das histologische Erscheinungsbild des Glioblastoms ist durch zahlreiche Mitosen, Endothelproliferation, Zellreichtum, pleomorphe Zellkerne und Nekrosen gekennzeichnet. Der Tumor führt zu einer diffusen Durchsetzung des umliegenden, gesunden Hirngewebes. Eine mikroskopisch vollständige Tumorentfernung ist technisch bedingt nicht möglich. Die verbleibenden Zellen führen nahezu unausweichlich zu Lokalreziven. Die Lokalrezidive sind für die kurze mediane Überlebenszeit der Patienten verantwortlich. Nur etwa 2-3% der Patienten sind Langzeitüberlebende (beim Glioblastom definiert als 3-Jahres-Überleben), eine Heilung ist eine Rarität [Stark et al., 2005; Yoshida et al., 2000].

Rudolf Virchow beschrieb das Glioblastom 1863 erstmals als hoch malignen astrozytären Tumor und bezeichnet ihn zunächst als „Spongioblastom“. Dieser Name wurde 1926 durch Bailey und Cushing in „Glioblastoma multiforme“ geändert. In der aktuellen Klassifikation der Tumore des Nervensystems der World Health Organisation (WHO) wird der Tumor mit dem Grad IV bezeichnet. Die Einteilung der WHO richtet sich dabei zum einen nach dem Zellursprung und zum anderen nach der Dignität. Letztere wird in vier Stufen eingeteilt: WHO I = benigne, WHO II = semi-benigne, WHO III = semi-maligne, WHO IV = maligne [Louis et al., 2007]. Zwei seltene Varianten des Glioblastoms sind das Riesenzellglioblastom

mit einem Anteil von 5% aller Glioblastome und das Gliosarkom mit einem Anteil von 2% [Kleihues et al., 1993; Louis et al., 2007]. Als weitere Unterteilung der Glioblastome wurde in der aktuellen Fassung der WHO-Klassifikation die Untergruppe der kleinzelligen und die der nicht-kleinzelligen Glioblastome eingefügt.

### **1.1.3 Primäre und sekundäre Genese**

Beim Glioblastom werden nach den Untersuchungen von Scherer, 1940 eine primäre und eine sekundäre Genese unterschieden. Primäre Tumoren entstehen innerhalb von drei Monaten ohne vorbekannte weniger maligne Vorstufen. Dagegen entwickeln sich sekundäre Glioblastome aus niedrig maligneren Vorstufen, vorwiegend aus Astrozytomen WHO Grad II (diffuses Astrozytom) und III (anaplastisches Astrozytom). Ein prognostischer Unterschied zwischen diesen beiden Entstehungsformen konnte bisher nicht gezeigt werden [von Ammon & Roelcke, 1994].

Diesen beiden Subformen können charakteristische, wenn auch nicht pathognomonische genetische Veränderungen zugeordnet werden. Zunehmend werden neben morphologischen und immunhistochemischen auch molekularbiologische Parameter zur Differenzierung mit einbezogen. Primäre Glioblastome sind durch Amplifikation oder Überexpression im Genlokus des „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR) und des zellulären Onkogens „Murine Double Minute“ 2 (MDM2) gekennzeichnet. Sekundäre Glioblastome weisen dagegen häufig Mutationen im Tumorsuppressorgen P53 auf. Ferner ist ein Verlust der Heterogenität für das Chromosom 19q typisch [Figarella-Branger et al., 2008]. Shukla und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der Verlust der Chromosomen 1p und 19q für oligodendrogliale Tumoren typisch ist und mit der Prognose korreliert [Shukla et al., 2009; Molinari et al., 2010].

### **1.1.4 Multizentrische und multifokale Glioblastome**

Das Glioblastom kann simultan an mehreren Stellen im Gehirn auftreten. Nach Batzdorf und Malamud, 1963 werden dabei als weitere Unterteilung multifokale von multizentrischen Tumoren unterschieden. Multifokale Tumore entstehen durch Ausbreitung der Tumorzellen über vorhandene anatomische Strukturen, wie z.B. dem Corpus callosum, dem Fornix oder der Capsula interna. Im Gegensatz dazu sind multizentrische Glioblastome getrennte Läsionen in unterschiedlichen Hirnlappen oder –hemisphären, die o.g. Ausbreitungswegen nicht

zugeordnet werden können. Multifokale und multizentrische Glioblastome können leicht als Hirnmetastasen fehlinterpretiert werden [Salvati et al., 2003]. Bei Patienten ohne bekannten Primärtumor ist immer eine histologische Sicherung anzustreben, sofern der Zustand des Patienten es erlaubt.

### **1.1.5 Lokalisation, Symptomatik und Diagnostik**

Die meisten Glioblastome finden sich supratentoriell. Dabei sind zumeist der Temporal- und der Frontallappen betroffen. Häufig sind bereits initial mehrere Hirnlappen beteiligt. Die Lokalisation im Gehirn bedingt wesentlich die Symptomatik. Die häufigsten Symptome sind: Hemiparese, neuropsychologische Veränderungen (Gedächtnisstörungen, Konzentrationsstörungen), Sprachstörungen, Anzeichen erhöhten intrakraniellen Druckes (Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen) und Krampfanfälle [Stark et al., 2005].

Die Diagnostik der Wahl ist die Magnetresonanztomographie (MRT) vor und nach Gadolinium-Kontrastmittelgabe. Dabei imponiert das Glioblastom charakteristischerweise als ringförmig Kontrastmittel anreichernder Prozess. Im Rahmen der Notfallversorgung wird häufig zunächst eine cranielle Computer-Tomographie durchgeführt und dann durch eine MRT komplettiert. Differentialdiagnostisch sind ein Hirnabszess und eine Metastase abzugrenzen.

Weitere, funktionelle Untersuchungen erfolgen ggf. entsprechend der Lage des Tumors: bei topographischer Nähe zum motorischen Cortex und/oder den Sprachzentren (Sprachverständnis und Sprachäußerung) kommt eine funktionelle Motorik- und/oder Sprach-MRT in Betracht. Diese zeigt nach Aktivierung des entsprechenden Hirnareals durch den Patienten eine farblich markierte Stoffwechseländerung. Damit kann das Risiko der operativen Entfernung in Bezug auf zu erwartende neurologische Defizite schärfer umrissen werden [Sunaert, 2006; Tieleman et al., 2007].

Mit Hilfe des MRT „Fiber Tracking“ kann die Pyramidenbahn direkt farbkodiert dargestellt werden und ermöglicht so eine genauere Lokalisation der motorischen Fasern [Cardenes et al., 2010].

### **1.1.6 Operative Behandlung**

Die offene, mikrochirurgische Tumorentfernung dient der Gewinnung einer definitiven Histologie und der Tumolvolumenreduktion. Es sollte möglichst eine Entfernung aller kontrastmittelanreichernden Areale vorgenommen werden. Diese „makroskopisch vollständige“ Resektion ist mit einem besseren Überleben der Patienten verbunden [Stummer et al., 2008]. Allerdings sollte der Tumor nur soweit entfernt werden, wie sich der neurologische Status des Patienten nicht verschlechtert. Für die Realisierung des Operationszieles stehen zahlreiche Hilfsmittel zur Verfügung. Die geläufigsten sollen hier kurz erläutert werden:

- Neuronavigation: Präoperativ werden dünnsschichtige MRT- oder CT-Aufnahmen mit Referenzmarkierungen am Kopf (sogenannte „Fiducials“) angefertigt. Diese Aufnahmen werden in ein Computersystem eingeladen und zu einem 3D-Modell aufbereitet. Der Operateur kann während des Eingriffes die Position eines Markierungsstabes im Operationssitus anhand des Computermodells überprüfen. Die Neuronavigation ist besonders für die Zugangsplanung und die Resektionskontrolle von Bedeutung [Willems et al., 2006].
- Intraoperative Magnetresonanztomographie (iMRT): Die iMRT ermöglicht eine Resektionskontrolle während der Operation. Dabei kann der Patient mit geöffnetem Schädel untersucht werden. Im Falle eines Resttumors wird die Operation unmittelbar fortgesetzt. Mit Ausnahme der Operation in Lokalanästhesie (s.u.) bleibt der Patient während der gesamten Zeit in Vollnarkose. Der Vorteil einer Hochfeld-MRT mit 1,5 Tesla (Maß für die Magnetfeldstärke) gegenüber Niederfeld-Apparaten mit 0,15-0,5 Tesla liegt in der sehr guten Bildqualität [Nabavi et al., 2009, Mislow et al., 2009].
- Fluoreszenzgestützte Resektion: 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) ist eine Vorstufe von Hämoglobin, die sich in malignen Tumoren anreichert. In einer prospektiven randomisierten Multizenterstudie wurde gezeigt, dass die fluoreszenzgestützte Resektion von malignen Gliomen zu einer signifikant höheren Rate makroskopisch komplett resezierter Tumore führt. Die komplette Resektion wiederum ist mit einem signifikant längeren Überleben assoziiert [Stummer et al., 2008]. 5-ALA wird vom Patienten einige Stunden vor der Operation getrunken. Unter einem speziellen Filter ist das anreichernde Tumorgewebe dann unter dem Operationsmikroskop lachsfarben zu erkennen.



- Intraoperative Einlage von BCNU-Wafern (Gliadel®): Durch diese Maßnahme kann eine moderate Lebenszeitverlängerung erreicht werden. In einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Phase-3-Studie an 240 Patienten betrug das mediane Überleben der Behandlungsgruppe 13,0 Monate versus 11,6 Monate in der Kontrollgruppe [Westphal et al., 2003]. Sobald die Tumorresektion abgeschlossen ist, werden je nach Größe der Resektionshöhle ca. 4-10 Wafer in die Höhle eingelegt. Die Wirkung hält ca. 2-3 Wochen an. Die Wirkung des Medikamentes ist bei dieser Applikationsform 113-mal größer als bei intravenöser Gabe [Grossman et al., 1992]. Typische Komplikationen sind dabei Wundheilungsstörungen, eine Zunahme des perifokalen Ödems und raumfordernde Tumor-Zysten [Attenello et al., 2008].
- Operation in Lokalanästhesie (sogenannte „Wachoperation“): Ziel der Operation eines Glioblastom-Patienten sollte immer die möglichst vollständige Tumorresektion sein, ohne dem Patienten zusätzlichen Schaden zuzufügen. Tumore in eloquenten Hirnarealen stellen deshalb eine besondere Herausforderung dar. Bei Tumoren in der Nähe des motorischen bzw. Sprachzentrums ist eine komplette Entfernung ohne postoperative erhöhte Morbidität häufig nicht möglich. Die Wachoperation ermöglicht das direkte neurologische Monitoring unter aktiver Mitarbeit des Patienten [Gupta et al., 2007]. Die Operation am „offenen“ Gehirn in lokaler Betäubung ist möglich, weil das Gehirn keine Schmerzrezeptoren besitzt. Es werden lediglich die Haut und die Dura betäubt. Die Patienten werden während der Operation von geschulten Neuropsychologen betreut, die auch intraoperativ Tests durchführen können. Die Kombination von Wachoperation und intraoperativer MRT-Bildgebung bedeutet eine Maximierung der Resektion unter Erhalt der neurologischen Funktion [Nabavi et al., 2009].
- Funktionelles Mapping: Mit diesem Verfahren können intraoperativ freigelegte Hirnareale direkt elektrisch stimuliert werden, um deren Funktion zu überprüfen. Das funktionelle Mapping ist ein valides Verfahren zur Erhaltung der neurologischen Funktion bei Patienten mit Tumoren, die an eloquente Hirnareale grenzen [Bello et al., 2009; Bertani et al., 2009; Gallentine et al., 2009; Kombos et al., 2009; Picht et al., 2009,].

### **1.1.7 Adjuvante Behandlung**

2005 wurden die Ergebnisse der EORTC-Studie zum Vergleich der Wirksamkeit von kombinierter postoperativer Radio-/Chemotherapie mit Temozolomid gegenüber Radiotherapie allein vorgestellt. Dabei wurden 573 Patienten aus 85 Behandlungszentren eingeschlossen. Es ergab sich ein medianer Überlebensvorteil für die kombiniert behandelten Patienten von 2,5 Monaten. Als Folge dieser Studie wurde die kombinierte Radio-/Chemotherapie zum Standard der adjuvanten Behandlung des Glioblastoms [Stupp et al., 2005]. Temozolomid (Temodal®) ist ein lipophiles Alkylans. Es wird nach oraler Anwendung schnell resorbiert und überwindet effektiv die Blut-Hirn-Schranke. Temozolomid reichert sich im Tumorgewebe an, durch die alkylierende Aktivität seiner Abbauprodukte kommt es zu einer frustranen Aktivierung des DNA-Mismatch-Reparatursystems (DNA Mismatch Repair, MMR) und schließlich zum programmierten Zelltod [Pepponi et al., 2003].

Als Reaktion auf die Wirkung des Temozolomid versucht der Körper, die chemotherapiebedingten Schäden mithilfe des Enzyms MGMT (O6-methylguanin-DNA-methyltransferase) zu reparieren. In einer ebenfalls 2005 publizierten Studie wurde das Überleben im EORTC-Patientenkollektiv in Abhängigkeit vom MGMT-Status der Patienten untersucht. Dabei war die Methylierung = epigenetische Stummschaltung der Promotorregion des MGMT-Gens mit einem verlängerten Überleben der Patienten assoziiert [Esteller et al., 2000; Hegi et al., 2005]. Die längsten Überlebensraten zeigten Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor und kombinierter Radio-/Chemotherapie. Aber auch Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promotor profitierten von der Temozolomid-Gabe: auch bei ihnen war das mediane Überleben signifikant länger als bei Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promotor, die lediglich Radiotherapie erhielten [Hegi et al., 2005].

### **1.1.8 Klinischer Verlauf bei Glioblastom-Patienten, Lokalrezidive**

Das Glioblastom ist durch die diffuse Infiltration des umliegenden Hirngewebes gekennzeichnet. Auch nach multidisziplinärer Behandlung mit Resektion aller kontrastmittelaufnehmenden Tumoranteile sowie kombinierter Radio-/Chemotherapie sind Rezidive nahezu unausweichlich. Das Lokalrezidiv ist bei Glioblastom-Patienten ursächlich für das stark reduzierte mediane Überleben. Die Rezidive treten gehäuft am Resektionsrand auf, können aber auch entfernt vom eigentlichen Tumor beobachtet werden. Metastasen treten

in ca. 1% der Patienten als sogenannte „spinale Abtropfmetastasen“ auf. Metastasen außerhalb des zentralen Nervensystems sind extrem selten.

Trotz der immensen klinischen Bedeutung der Lokalrezidive sind experimentelle Untersuchungen an initialen- versus Rezidiv-Glioblastomen sehr selten.

## **1.2 Das DNA-Mismatch-Reparatur System (MMR)**

Die Mismatch Repair (MMR) Proteine spielen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität [Kunkel & Erie, 2005]. MMR-Proteine korrigieren Base/Base und Insertion/Deletion Mismatches, die während der DNA-Replikation auftreten [Wyatt & Wilson III, 2009].

DNA Doppelstrangbrüche, die wichtigste Form der Schädigung der Erbsubstanz, können durch verschiedene Faktoren verursacht werden wie beispielsweise die UV-Strahlung. Zhang et al. zeigten, dass eine fehlerhafte DNA zum Abbruch des Zellzyklus und damit zur Apoptose führen kann. Die Akkumulation fehlerhaft korrigierter DNA-Schädigung kann allerdings auch eine Chromosomeninstabilität verursachen und somit Grundlage einer malignen Erkrankung sein [Zhang et al., 2009].

Die Bedeutung der MMR-Faktoren für das Entstehen von malignem Wachstum wurde ursprünglich anhand des hereditären nonpolyposen **Kolonkarzinoms** (Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) aufgezeigt [Bonis et al., 2007]. Mittlerweile wurde sie für zahlreiche maligne Tumoren nachgewiesen [Backes et al., 2009; Ding et al., 2009; Gu et al., 2002; Wang et al., 2001].

Die wichtigsten MMR-Proteine sind MLH1, MSH2 und MSH6. Die Funktion dieser Proteine ist wie folgt: Base/Base Mismatches werden von dem MSH2-MSH6 Komplex erkannt. Daraufhin erfolgt die Aktivierung von MLH1. Die Rekrutierung von MLH1 signalisiert Exonukleasen, den Tochterstrang mit dem Mismatchprodukt abzubauen. Daraufhin wird die fehlerhafte DNA durch die Aktivierung der DNA-Polymerase und der DNA-Ligase ergänzt [Kolodner & Marsischky, 1999; Hsieh, 2001; Wyatt & Wilson III, 2009]. Eine Veränderung oder ein Fehler der MMR-Proteine führt zur genetischen Instabilität [Kunkel & Erie, 2009]. Diese Instabilität kann in Form von Mikrosatelliteninstabilität (Microsatellite Instability, MSI) quantifiziert werden. Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Sequenzen, deren veränderte Länge mit genetischer Instabilität einhergeht [Hsieh, 2001].

Über die Expression von MMR-Proteinen in Glioblastomen gibt es bisher recht wenige Daten, über die Expression in initialen versus Rezidiv-Glioblastomen fast keine. Leung et. al untersuchten 22 Gliome, davon 17 Glioblastome, 3 anaplastische Astrozytome und 2 gemischte Gliome Grade III und stellten fest, dass 18% der jungen Patienten erhebliche Defekte im MMR Systems aufwiesen [Leung et al., 1998]. Kanamori et al. berichteten, dass ein Fehlen von MLH1 mit dem Auftreten von Gliomen bei jungen Patienten korrelierte [Kanamori et al., 2000]. Ähnliche Ergebnisse ergab die Arbeit von Szybka et al., 2003: die genetische Instabilität bei Astrozytomen von Kindern war im Vergleich zu derer bei Erwachsenen deutlich erhöht. In einer großen Studie wurde die MSI in Kindern versus Erwachsenen mit Tumoren des zentralen Nervensystems bestimmt [Hegi et al., 2008]. Dabei zeigte sich eine Akkumulation von MSI in Kindern mit malignen Tumoren. Die wenigen Daten über MMR-Faktoren bei Patienten mit initialen Glioblastomen versus Rezidiven nach kombinierter Radio-/Chemotherapie ergaben folgende Ergebnisse: Cahill et al. zeigten 2007, dass die fehlende MSH6-Expression mit der Tumorprogression und der Resistenz gegen Temozolomid-Chemotherapie zusammenhing. Die Arbeit von Yip et al, 2009 zeigte, dass MSH6-Mutationen zur Resistenz gegen Temozolomid führen können.

### **1.3 Fragestellung**

Ziel dieser immunhistochemisch-experimentellen Studie war es, die Expression der MMR-Proteine MLH1, MSH2 und MSH6 in Glioblastom-Rezidiven versus initialen Tumoren zu bestimmen und die Ergebnisse mit dem Ki67 Proliferationsindex und dem Überleben der Patienten zu vergleichen. Im Detail waren die folgenden Arbeitsschritte zu bewältigen:

- Ermittlung der Proteinexpression von MLH1, MSH2 und MSH6 anhand gepaarter Proben von 42 Glioblastom-Patienten (initial- und 1. Rezidivtumor) die immunhistochemischen Ergebnisse sollten
- Vergleich der Expression in initialen und Rezidiv-Tumoren
- Vergleich der Expression mit dem Ki67-Proliferationsindex
- Vergleich der Expression mit dem Gesamt-Überleben im Patientenkollektiv

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

Zwischen Januar 2000 und September 2006 wurden 244 Patienten in der Klinik für Neurochirurgie UK S-H Campus Kiel an einem Glioblastom (WHO Grad IV) operiert. 84 Patienten (34.4%) erhielten mindestens eine Reoperation bei Tumorrezidiv. Die Einschlusskriterien in unserer Studie waren wie folgt:

- Primäres Glioblastom nach der Definition von Scherer, 1940
- Makroskopisch vollständige Resektion bei der Erstoperation
- Mindestens eine Reoperation bei MR-tomographisch nachgewiesenem Tumorrezidiv
- Nachweis vitaler Tumorzellen im histologischen Präparat des Rezidivs

Das Ausmaß der Tumorentfernung wurde anhand der postoperativen Magnetresonanztomographie innerhalb von 72h nach der Operation bestimmt. Eine makroskopisch vollständige Tumorentfernung wurde durch die fehlende Kontrastmittelaufnahme definiert. 42 Patienten erfüllten die oben genannten Kriterien. Alle Patienten erhielten eine adjuvante postoperative Bestrahlung von mindestens 54 Gy. 19 Patienten erhielten Temozolomid nach der Rezidiv-Operation, 2 Patienten erhielten eine adjuvante kombinierte Strahlen-/Chemotherapie mit Temozolomid gefolgt von einer Temozolomid-Erhaltungstherapie nach der EORTC-Studie [Stupp et al, 2005].

### **2.2. Immunhistochemische Untersuchungen**

Von dem in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden 2µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die getrockneten Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70%; jeweils 5 Min.) rehydriert.

#### **2.2.1 Hematoxylin-Eosin-Färbung**

Die weitere Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll bei Raumtemperatur:

- Hämalanfärbung (5 min.)
- bläuen in Leitungswasser (5 min.)

- 0,1 % Eosin (1 min.)
- kurz in aqua dest. spülen
- aufsteigenden Alkoholreihe (96 %, 96%, 100%, 100%; jeweils 5 min.)
- Xylol (2 x 5 min.)
- Eindecken mit Pertex (Medite)

### **2.2.2 Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen MLH1, MSH2 und MSH6**

Nach der Rehydrierung erfolgte die Vorbehandlung im Autoklaven zur Antigen-Demaskierung (4 min bei 120°C in Citrat-Puffer). Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte in Methanol und 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10 Minuten.

Anschließend Inkubation in 96% und 70% Alkohol, dann in Aqua dest. (jeweils 5 min.) sowie in TBS-Puffer (3 x 5 min.)

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen monoklonalen Antikörper in der Verdünnung 1:50 für 1 Stunde bei 37°C:

- MLH1 (Klon G168-15, Zytomed Systems, Berlin)
- MSH2 (Klon FE-11, Zytomed Systems, Berlin)
- MSH6 (Klon 44, Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA, USA)

Danach Spülen in Aqua dest. und in TBS Puffer (3 x 5 min.). Anschließend Detektion mit EnVision (Dako, Hamburg) für 30 min. Nach Spülen mit Aqua dest. und TBS- Puffer erfolgte die Zugabe von AEC-Chromogen (20 min.). Anschließend Kernfärbung mit Hämalaun für 5 min. und Bläuen in fließendem Leitungswasser. Eindecken der Präparate in Aquatex (Merck, Darmstadt).

### **2.2.3 Färbung mit MIB-1**

Die Färbung mit dem MIB-1 Antikörper (Dako, Hamburg) zur Ermittlung des Ki 67 Proliferationsindex (Ki67 PI) erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei MLH1, MSH2 und MSH6. Lediglich die Vorbehandlung im Schnellkochtopf (4 min. bei 120 Grad C) wurde mit EDTA – Puffer durchgeführt.

#### **2.2.4 Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen**

Die Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse mit anti-MLH1, anti-MSH2 und anti-MSH6 erfolgte nach folgendem Schema:

- (0) negative Kernfärbung
- (1) <5% angefärbte Kerne
- (2) zwischen 5 und 60% angefärbte Kerne
- (3) >60% angefärbte Kerne

Zur statistischen Analyse wurde ein Wert von 0-2 als negativ eingestuft, ein Wert von 3 als positiv (Newcomb et al., 1998; Velasco et al., 2002; Stark et al., 2003). Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Präparat gezählt.

Die Ermittlung des Ki67 PI erfolgte in Arealen maximaler Dichte, auch hier wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Präparat gezählt. Die Expression wurde in Prozent angegeben.

Der Chi-Quadrat-Test wurde zum Vergleich der Häufigkeit eines Parameters in zwei Gruppen eingesetzt. Mit dem Wilcoxon Test wurde die Proteinexpression in zwei verschiedenen Gruppen verglichen. Der Log-rank Test (Cox-Mantel) wurde angewendet, um den Zusammenhang zwischen Überlebenszeit und Proteinexpression zu untersuchen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Klinische Charakteristika der 42 Patienten**

Das mediane Alter der 42 in die Studie eingeschlossenen Patienten lag bei 61 Jahren (Intervall: 35-89 Jahre). 26 Patienten waren männlich, 16 weiblich (Verteilung männlich:weiblich = 1,6:1). Die Lokalisation der Tumore war wie folgt: temporal n=17, multilobulär n=10, frontal n=8, parietal n=4, occipital n=3.

Die häufigsten Symptome bei Diagnose waren: Neuropsychologische Veränderungen (n=17), Krampfanfälle (n=15), Hemiparese (n=12), Aphasie (n=12) und Kopfschmerzen /Übelkeit/ Erbrechen als Zeichen erhöhten intrakraniellen Druckes (n=11). Seltener traten Sehstörungen (n=4), Schwindel (n=3) und Hirnnervenstörungen (n=3) auf. In drei Fällen handelte es sich um Zufallsbefunde.

Der mediane prä-operative Karnofsky Performance Score (KPS) betrug 70, der mediane post-operative KPS dagegen 80. Der mittlere zeitliche Abstand zwischen initialer Operation und Rezidivoperation betrug 7,7 Monate (Intervall: 1-22 Monate). Spinale Abtropfmetastasen oder Metastasen an Organen außerhalb des ZNS wurden in diesem Kollektiv nicht beobachtet.

#### **3.2 Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen**

##### **3.2.1 Expression von MLH1/MSH2/MSH6 in initialen versus Rezidiv-Tumoren**

MLH1 wurde in allen initialen Tumoren sowie in allen außer einem Rezidiv-Tumor nachgewiesen. Die mittlere Expression betrug 73.2% in initialen Tumoren und 63.2% in Rezidiven. Nach dem Wilcoxon-Test war die MLH1-Expression in Rezidiven signifikant niedriger als diejenige in initialen Läsionen ( $p=0,015$ ). Auch die Anzahl positiver Präparate war in den Rezidiven signifikant geringer (Chi-Quadrat-Test,  $p=0,013$ ).

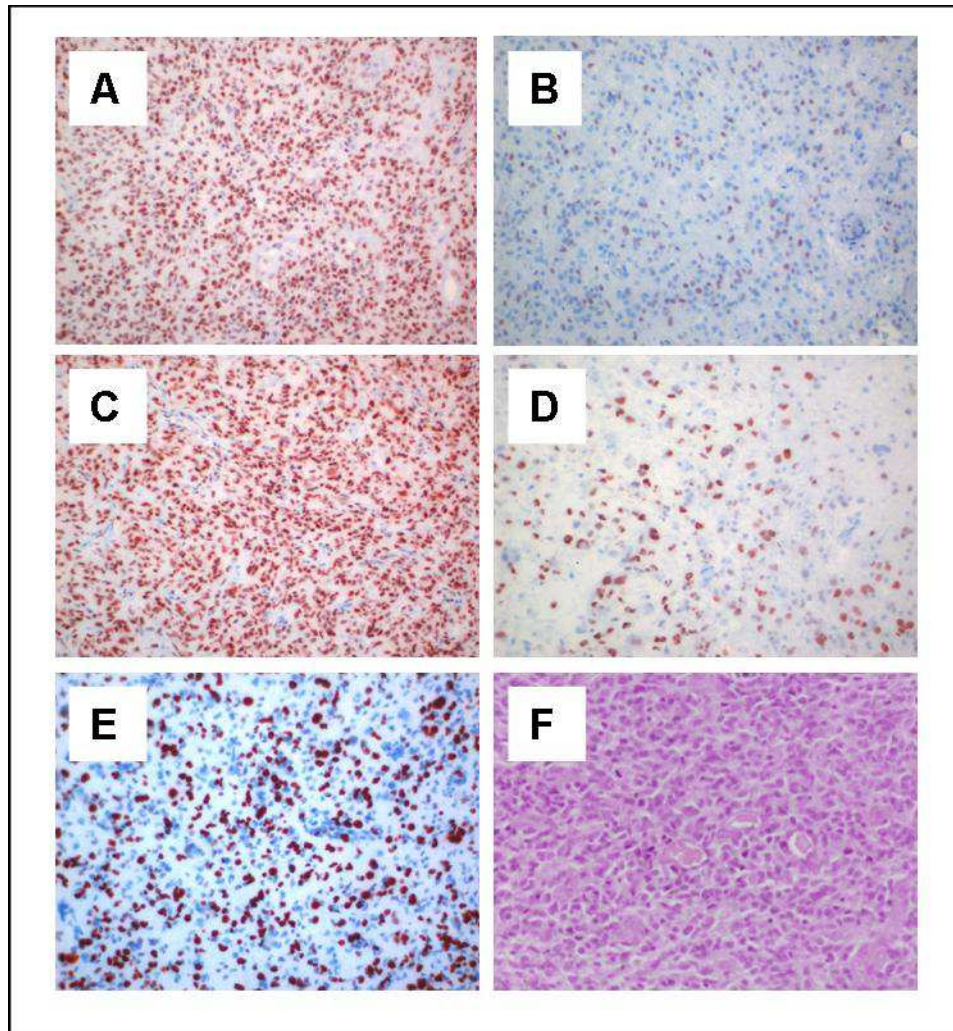
MSH2 war in allen initialen Tumoren und in allen Rezidiven nachweisbar. Die mittlere Expression betrug 75,1% in initialen Läsionen und 71,9% in Rezidiven. Gemäß statistischer Analyse bestand hier kein signifikanter Unterschied.

MSH6 war in allen initialen Tumoren und in allen Rezidiven nachweisbar. Die mittlere Expression betrug 25,2% in initialen Tumoren und 25,6% in Rezidiven. Gemäß statistischer



Analyse bestand kein signifikanter Unterschied. Beispiele der immunhistochemischen Färbungen sind in Abb. 1 dargestellt.

**Abbildung 1: Exemplarische Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung**



Legende: (A) MLH1-Färbung im initialen Tumor (77% positive Kerne) versus (B) MLH1-Färbung im Rezidivtumor des selben Patienten (42% positive Kerne). (C) Färbung mit anti-MSH2, (D) Färbung mit anti-MSH6, (E) Färbung mit anti-Ki67/MIB-1), (F) Hematoxylin-Eosin Färbung eines Glioblastoms mit Mitosen, Kernpolymorphien, Endothelproliferation und Nekrosen.

### **3.2.2 Expression von Ki67 in initialen Tumoren und Rezidiven**

Der mittlere Ki67-Proliferationsindex (Ki67 PI) in initialen Tumoren betrug 30,4%, der mittlere Ki67 PI in Rezidiven 26,0%. Gemäß dem Wilcoxon-Test waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant.

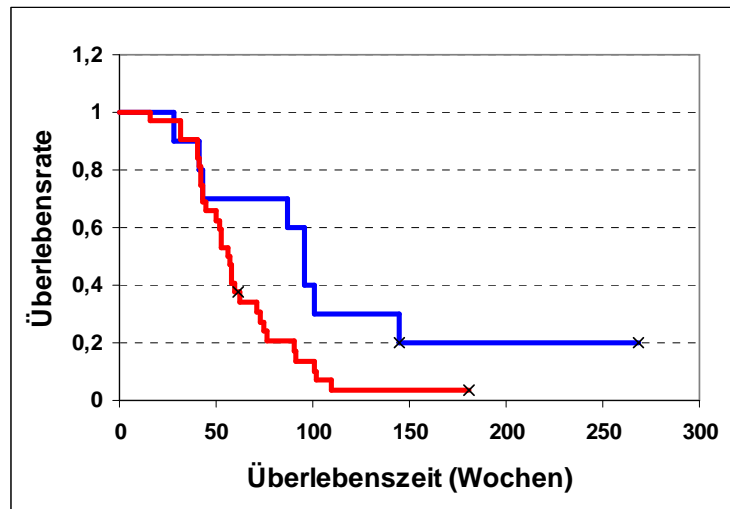
### **3.2.3 Korrelation zwischen der Expression von MLH1/MSH2/MSH6 und dem Ki-67 Proliferationsindex (Ki67 PI)**

Die Expression von MLH1, MSH2 und MSH6 in initialen Glioblastomen war signifikant mit dem Ki67 Proliferationsindex assoziiert (Wilcoxon-Test,  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,019$ ). Die Expression von MLH1 und MSH2 in Rezidiv-Glioblastomen war ebenfalls signifikant mit dem Ki67 PI assoziiert (Wilcoxon-Test, jeweils  $p < 0,001$ ). Die Expression von MSH6 in Tumorrezidiven korrelierte nicht mit dem Proliferationsindex.

### **3.2.4 Korrelation zwischen der MLH1/MSH2/MSH6 Expression und der Überlebenszeit**

Gemäß dem Log rank Test / Kaplan Meier Kurven war die Expression von MLH1 in initialen Tumoren signifikant mit dem Überleben der Patienten assoziiert ( $p = 0,049$ ). Dabei zeigten Patienten mit negativer MLH1-Expression ein verlängertes Überleben gegenüber Individuen mit positiver Expression. Die Kaplan-Meier Kurve ist in Abbildung 2 dargestellt. Für die MLH1-Expression in Rezidiven fand sich keine Korrelation zum Gesamtüberleben der Patienten.

**Abbildung 2: Gesamtüberlebenszeit der Patienten in Abhängigkeit von der MLH1-Expression in initialen Tumoren.**

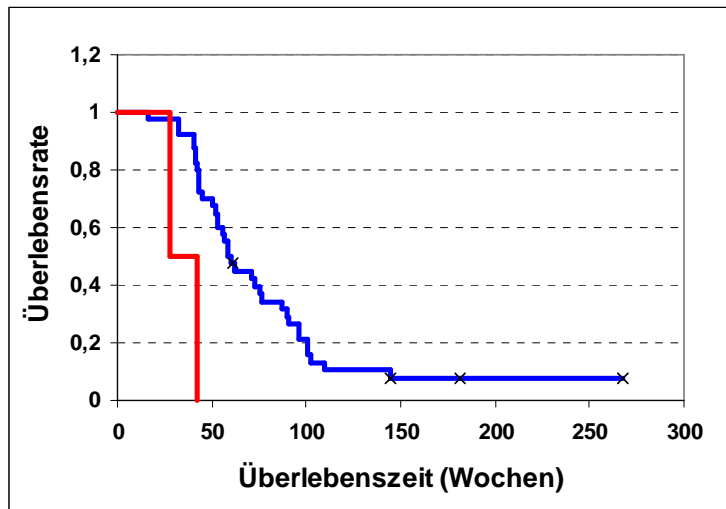


Legende: MLH1-Negativität (blaue Kurve) ist mit einem längeren Überleben assoziiert als MLH1-Positivität (rote Kurve,  $p=0,049$ ).

Die Expression von MSH2 in initialen Tumoren und Rezidiven war nicht signifikant mit dem Überleben der Patienten assoziiert.

Für MSH6 fand sich eine ähnliche Beobachtung wie für MLH1. Auch hier war die negative Expression signifikant mit einem verlängerten Überleben assoziiert ( $p=0,002$ ). Die Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 3 dargestellt. Für die MSH6-Expression in Rezidiven fand sich keine Korrelation zum Überleben der Patienten.

**Abbildung 3: Überlebenszeit der Patienten in Abhängigkeit von der MSH6-Expression in initialen Tumoren.**



Legende: MLH6-Negativität (blaue Kurve) ist mit einem verlängerten Überleben assoziiert als MLH6-Positivität (rote Kurve,  $p=0,002$ ).

Die vollständigen klinischen Daten und die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der 42 Patienten sind im Anhang dargestellt.

#### 4. Diskussion

Das Glioblastom ist der häufigste und bösartigste hirneigene Tumor des Erwachsenen. Der Tumor wird nach der WHO als Grad IV-Läsion einteilt [Louis et al, 2007]. Es werden eine primäre Genese ohne vorbekannte niedergradigere gliomatöse Tumore und eine sekundäre Genese aus niedrigmaligneren „Vorstufen“ unterschieden [Scherer, 1940]. Die besondere Eigenschaft des Glioblastoms ist die diffuse Infiltration des umgebenden, gesunden Hirngewebes. Eine mikroskopisch komplette Tumorentfernung ist daher nicht möglich. Rezidive sind unausweichlich [Louis et al, 2007].

Das Ziel der Operation ist die maximal mögliche sichere Resektion („maximum safe resection“) [Olson et al, 2009]. Dabei wird möglichst viel Tumorgewebe entfernt ohne zusätzliche neurologische Defizite zu verursachen. An die Operation schliesst sich die kombinierte Radio-/Chemotherapie mit Temozolomid, gefolgt von einer Temozolomid-Erhaltungstherapie, an. In einer 2005 publizierten EORTC-Studie an 573 Patienten konnte gezeigt werden, daß mit dieser Behandlung ein medianes Überleben von 14,6 Monaten erreicht werden kann [Stupp et al., 2005].

Die Rate an Langzeitüberlebenden, bei Glioblastom-Patienten als postoperatives Überleben von mindestens drei Jahren nach Diagnose definiert, liegt bei ca. 2-3 %. Eine Heilung wurde lediglich in einzelnen Fallberichten beschrieben [Louis et al, 2007; Scott et al, 1998; Scott et al, 1999; Stark et al, 2005].

Das von Stupp et al. publizierte Patientengut wurde auch auf die Methylierung der Promotorregion des MGMT-Gens = epigenetische Stummschaltung des Gens untersucht. Das Enzym MGMT (O6-methylguanin-DNA-methyltransferase) gehört zum körpereigenen DNA-Reparaturmechanismus („DNA mismatch repair“, MMR). Die Methylierung von MGMT war in der Untersuchung von Hegi et al. anhand des oben erwähnten Kollektivs der EORTC-Studie mit einem verlängerten Überleben nach Operation und adjuvanter kombinierter Radio-/Chemotherapie mit Temozolomid assoziiert [Hegi et al., 2005].

Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass der Tumor seine DNA nicht oder nicht mehr in erheblichem Umfang reparieren kann. MGMT spielt hier nachweislich eine wesentliche Rolle, allerdings gibt es Hinweise auf weitere MMR-Gene, die für das Ansprechen des Tumors auf Chemotherapeutika, speziell auf Temozolomid, verantwortlich sind [Goellner et

al. 2011]. Diese Beobachtung hat die Aufmerksamkeit auch auf weitere Faktoren des *Mismatch-Repair-Systems* gerichtet.

Das Mismatch Repair System (MMR) spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität. Eine fehlerhafte Funktion der MMR-Proteine kann eine genetische Instabilität verursachen und damit eine Grundlage für die Tumorentstehung darstellen [Kunkel & Erie, 2005; Wyatt & Wilson III, 2009].

Die bedeutende Rolle der MMR-Proteine für die Tumorentstehung wurde initial beim **H**ereditären **n**on**p**olypösen **K**olon**k**arzinom (Hereditary non-polyposis colorectal cancer, **HNPCC**) aufgezeigt [Bonis et al., 2007]. Es wurde hierbei nachgewiesen, dass 95% der Patienten mit HNPCC eine Mutation von Genen des MMR-Systems aufwiesen [Ziadi S et al., 2011].

Defekte im MMR-System führen zur Instabilität von Mikrosatteliten. Unter Mikrosatteliten werden in diesem Zusammenhang repetitive DNA-Sequenzen verstanden, deren Instabilität (microsatellite instability, MSI) eine wesentliche Ursache für die Entstehung maligner Tumore zu sein scheint. Die MSI kann mittels spezifischer Marker in der Polymerase-Ketten-Reaktion gemessen werden: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 and MONO-27 [Hsieh, 2001; Kolodner et al., 1999; Kunkel and Erie, 2005]. Zudem besteht die Möglichkeit der direkten immunhistochemischen Färbung. Bei Patienten mit Glioblastomen werden derartige Tests bisher nicht regelmäßig durchgeführt, da die genaue Rolle der MMR Proteine, der MSI und ihre mögliche Korrelation zu biologischen Markern, wie dem Proliferationsindex, und der Assoziation zur Überlebenszeit nicht ausreichend untersucht wurde.

Defekte im MMR-System können auch syndromale Erscheinungen hervorrufen. Beim Muir-Torre-Syndrom besteht eine Keimbahnmutation der DNA-Reperaturgene MLH1 oder MSH2. Das seltene Syndrom wird autosomal dominant vererbt und ist durch das Auftreten von Tumoren der Speicheldrüsen und der inneren Organe charakterisiert [Muir et al, 1967; Torre, 1968].

In einem Fallbericht wird auch das Auftreten eines Glioblastoms (WHO Grad IV) berichtet. Dabei handelt es sich um einen 58-jährigen Mann mit der medizinischen Vorgeschichte eines kolorektalen Karzinoms, der jetzt mit einer linksseitigen Gefühlstörung des Körpers auffällig wurde. Bei der Inspektion der Haut fanden sich multiple sebazöse Adenome. In der MRT

wurde ein rechts parietaler intrazerebraler Tumor diagnostiziert und operiert. Die histologische Untersuchung ergab ein Glioblastom mit einem recht hohen Proliferationsindex von 25%. Bemerkenswerterweise war die Schwester des Patienten einige Jahre zuvor an einem Glioblastom verstorben. Die immunhistochemische Untersuchung ergab ein Fehlen der Expression von DNA-Mismatch-Reparatur-Genen und eine erhebliche Instabilität der Mikrosatelliten [Park et al, 2009].

Das Ziel der hier vorliegenden Studie war es, die Expression der DNA-Mismatch-Reparatur-Gene MLH1, MSH2 und MSH6 in gepaarten Proben von Initial- und Rezidiv-Glioblastomen auf Proteinebene zu bestimmen. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Ki67-Proliferationsindex (Ki67 PI) und dem Überleben der Patienten verglichen. Bei Ki-67 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der gegen ein nukleäres Antigen gerichtet ist, das ausschließlich in der G1, S, G2 und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird [Zuber et al, 1988].

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass die Expression von MLH1 in Rezidiven signifikant geringer war als in gepaarten initialen Tumoren. Die Expression von MSH2 und MSH6 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Initialen- und Rezidiv-Glioblastomen. Die Proteinexpression von MLH1, MSH2 und MSH6 in initialen Tumoren war darüber hinaus signifikant mit dem Proliferationsindex (Ki67 PI) assoziiert, so wie auch die Expression von MLH1 und MSH2 in Rezidiven. Die Expression von MLH1 und MSH6 in initialen Tumoren war signifikant mit dem Überleben der Patienten assoziiert. Die Expression von MSH2 war nicht mit dem Überleben der Patienten assoziiert.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Immunhistochemie als semiquantitatives Verfahren eine begrenzte Aussagefähigkeit hat. Ein derartiges Kollektiv von gepaarten Tumorproben ist sicherlich sehr selten, dennoch ist die Fallzahl insgesamt als gering anzusehen. Eine multivariate Analyse war daher nicht möglich. Die Anzahl der MSH6-positiven Patienten betrug  $n=2$  und war damit sehr gering.

Die maligne Transformation neuroepithelialer Zellen bis hin zum Glioblastom ist mit einer Akkumulation genetischer Defekte verbunden. Dabei gibt es charakteristische, wenn auch nicht pathognomonische Unterschiede zwischen primären und sekundären Glioblastomen

(siehe auch Einleitung, S. 2) [Louis et al, 2007]. Das Expressionsprofil von Glioblastomen unterscheidet sich erwartungsgemäß von dem anderer glialer Neoplasien, wie z.B. dem pilozytischen Astrozytom (WHO Grad I), niedergradigen Astrozytomen (WHO Grad II), anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) und Oligodendrogliomen [Rickman et al, 2001; Jiang et al, 2006]. Interessanterweise zeigen sich aber auch signifikante Unterschiede im Expressionsprofil verschiedener Glioblastome, die diesen Tumor als genetisch heterogene Entität mit hoher genetischer Instabilität erscheinen lassen [Louis et al, 2007].

Anhand von Array-Untersuchungen wurde eine hohe Expression von Wachstumsfaktoren, Zellmigrationsfaktoren und Faktoren der Angiogenese in Glioblastomen beschrieben [Godard et al, 2003; Liang et al, 2005; Rich et al, 2005]. In der Studie von Liang et al. konnten darüber hinaus aufgrund des Genexpressionsmusters zwei prognostisch unterschiedliche Gruppen von Glioblastompatienten definiert werden [Liang et al, 2005].

Das Glioblastom-Rezidiv bestimmt die Prognose. Da Fernmetastasen (Metastasen in Organe außerhalb des ZNS) extrem selten sind und spinale Abtropfmetastasen in lediglich 1-2 % der Patienten [Stark et al, 2005] vorkommen bzw. unter Temozolomid-Behandlung noch seltener oder gar nicht mehr beobachtet werden [Stark, persönliche Kommunikation], definiert sich die Prognose der Patienten nahezu allein durch das regelhafte aber zeitlich recht unterschiedliche Auftreten des Lokalrezidivs. Dieses entsteht zumeist im Bereich des Resektionsrandes, es ist aber auch das Auftreten an weiteren Lokalisationen innerhalb des Gehirns möglich. Dabei breiten sich Tumorzellen entlang der neuralen Bahnen als „Leitschienen“ aus und führen dann zu Rezidiven, die vom eigentlichen Resektionsbereich entfernt liegen [Louis et al, 2007].

Trotz der immensen Bedeutung des Lokalrezidivs gibt es erstaunlicherweise nur sehr wenige Daten zu genetischen Veränderungen in initialen- versus Rezidivtumoren. Dieser Vergleich ist jedoch besonders interessant, da davon ausgegangen werden kann, dass während der Tumorprogression Eigenschaften potenziert werden, die die Aggressivität des Tumors steigern. Diese potenzierten Eigenschaften sollten sich auch im Expressionsprofil zeigen.

Für die Untersuchungen kommen aufgrund der oben erwähnten erheblichen Heterogenität des Glioblastoms, selbst wenn ausschließlich primäre Tumore verwendet und die sekundären ausgeschlossen werden, nur gepaarte Tumorproben in Frage. Da die Indikation zur Rezidivoperation nach wie vor nicht unumstritten ist [Olson et al, 2009], können hier nur



kleinere Patientenserien zusammengetragen werden. Wenn Patienten in unterschiedlichen Kliniken an den Initial- und Rezidiv-Tumoren operiert wurden, kommen logistische Schwierigkeiten hinzu. So entstehen in der Regel selbst in großen Zentren nur recht kleine Serien über einen relativ langen Zeitraum.

Strik et al. publizierten 1999 eine immunhistochemische Untersuchung an 37 gepaarten Proben von initialen Glioblastomen und Rezidiven. Sie beschrieben dabei eine Hochregulation von anti-apoptotischen und eine Herunterregulation von pro-apoptotischen Faktoren der BCL-2 Familie [Strik et al., 1999]. Diese Veränderungen waren bei Patienten, die mit Chemo- und Radiotherapie behandelt worden waren, deutlicher ausgeprägter als bei denjenigen Patienten, die keine adjuvante Therapie erhielten.

Stark et al. zeigten 2003 anhand von 27 gepaarten Proben eine reduzierte Expression des Tumorsuppressorproteins p53 und MSH2 in Glioblastom-Rezidiven im Vergleich zu initialen Tumoren auf. Dabei bestand ein Zusammenhang zwischen der Expression von MSH2 und der applizierten Chemotherapie. Zudem war die Anzahl der mdm2- (murine double minute 2, zelluläres Onkogen) und EGFR- (epidermal growth factor receptor) positiver Tumore in Rezidiven signifikant geringer [Stark et al., 2003]. Eine ähnliche Beobachtung wurde kurze Zeit später auch von Rellecke et al. beschrieben [Rellecke et al, 2004]. In beiden Studien zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen der Proteinexpression und der Überlebenszeit der Patienten.

Andere Untersuchungen ergaben keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression ausgewählter Parameter in Initial- versus Rezidiv-Glioblastomen. So konnten Strege et al. zeigen, dass die Faktoren Fas (CD95, transmembranöses Glykoprotein), Fas Ligand (Membranprotein, Apoptose-auslösend), Bcl-2 (anti-apoptotisches Onkogen) und TGFβ2 (transforming growth factor beta, beteiligt an Zellwachstum und Differenzierung) zwar in pilozytischen Astrozytomen (WHO Grad I) versus Glioblastomen unterschiedlich exprimiert wurden. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen Initialen- und Rezidiv-Glioblastomen [Strege et al, 2004].

Für die hier vorgelegten Untersuchungen wurde ein Kollektiv von 244 Patienten gesichtet, von denen 84 Patienten mindestens eine Rezidiv-Operation erhielten. Die Einschlusskriterien zielten auf eine Homogenisierung des Kollektivs zur besseren Auswertung. Dabei konnten

letztlich 42 Patienten eingeschlossen werden, von denen jeweils die initialen und die Rezidiv-Tumoren immunhistochemisch untersucht wurden.

Informationen über die Expression von DNA-Mismatch-Reparatur-Genen in Glioblastomen im Allgemeinen und in Glioblastom-Rezidiven im Speziellen sind in der Literatur spärlich. MLH1 Protein ist häufig in humanen Glioblastomen mit Mikrosatteliteninstabilität (MSI) exprimiert [Martinez et al., 2004]. In unserer Serie war MLH1 in allen initialen und in allen außer einem Rezidiv-Tumor exprimiert. Interessanterweise fanden wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen der MLH1-Positivität und dem verkürzten Überleben der Patienten (Log Rank Test, univariate Analyse). Diese Beobachtung kann durch die Akkumulation eines nicht funktionellen, alterierten Proteins erklärt werden. Für das kolorektale Karzinom wurde bereits ein Zusammenhang zwischen geringer MLH1-mRNA Expression und verlängertem Überleben beschrieben [Ide et al., 2008]. In unserer Serie war zudem die MLH1-Expression in initialen und in Rezidiv-Tumoren signifikant mit dem Proliferationsindex (Ki67 PI) assoziiert.

Im Gegensatz zu MLH1 und MSH6 ist die Expression von MSH2 im Glioblastom recht variabel. Stark et al haben 2003 eine verminderte MSH2-Expression in Glioblastom-Rezidiven beschrieben, die einen Zusammenhang mit der Chemotherapie zeigte. Es muss hier angemerkt werden, dass die Daten vor der "Temozolomid-Ära" erhoben wurden. In unserer jetzigen Serie war die Expression von MSH2 weniger häufig in Rezidiven, der Unterschied war aber nicht statistisch signifikant. Ein Zusammenhang mit der applizierten Chemotherapie zeigte sich nicht. Allerdings zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen der MSH2-Expression und dem Ki67 PI (in initialen- und in Rezidiv-Tumoren).

2007 publizierten Cahill et al. eine Studie zur MSH6-Expression in Glioblastom-Rezidiven versus initialen Tumoren. Dabei zeigte sich ein MSH6-Verlust in 7/17 Rezidiven. Der MSH6-Status korrelierte nicht mit dem MGMT-Status. MSH6-Mutationen fanden sich ausschließlich in Rezidiven. Obwohl es auch gegenläufige Ergebnisse anderer Studien gibt [Maxwell et al., 2008], kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das Fehlen von MSH6 zu einem Fortschreiten des Glioblastom-Rezidivs führt.

In unserer Serie von 42 Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der MSH6-Expression in initialen Tumoren versus Rezidiven. Allerdings zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen der MSH6-Expression und dem Ki67 PI (initiale Tumore) sowie auch

zwischen der MSH6-Expression und dem Überleben der Patienten. Dabei war wiederum eine fehlende MSH6-Expression mit einer verlängerten Überlebenszeit verbunden (LogRank Test, univariate Analyse). Verglichen mit MLH1 und MSH2 waren in den Präparaten deutlich weniger Zellen mit anti-MSH6 angefärbt.

Gemäß der aktuellen Literatur verdichten sich die Hinweise, daß Mutationen im MSH6-Gen eine bedeutende Rolle beim Fortschreiten des Glioblastoms zukommt. So beschrieben Yip et al. jüngst das Auftreten von MSH6-Mutation in Glioblastom-Rezdiven nach der Chemotherapie. In gepaarten Tumorproben von initialen Tumoren vor jeglicher Behandlung fanden sich diese Mutationen nicht. Auch in der Zellkultur ließ sich ein entsprechender Effekt zeigen: die chronische Exposition einer Glioblastom-Zelllinie mit Temozolomid führte zum Entstehen resistenter Zellklone, einer davon wies eine MSH6-Mutation auf. Auch verlängerte die Stummschaltung von MSH6 das Überleben der Zellen unter zytotoxischen Dosen von Temozolomid. MSH6 kann damit als bedeutender Mediator der Temozolomid-Toxizität gelten. Die Inaktivierung von MSH6 ist mit dem Therapieversagen beim Glioblastom assoziiert [Yip et al, 2009].

In einer weiteren aktuellen Studie untersuchten Felsberg et al. Faktoren, die verantwortlich für die ausgeprägte Rezidivtendenz der Glioblastome sein könnten [Felsberg et al., 2011]. Es wurde gezeigt, dass eine reduzierte Expression der MMR-Proteine kombiniert mit dem unveränderten Methylierungsstatus von MGMT charakteristisch für die Rezidivtendenz ist. Die Ergebnisse der Studie zeigten zudem auf, dass die Promotoren der übrigen MMR-Gene ebenfalls nicht methyliert waren. Felsberg et al. zeigten ferner, dass die MMR Proteine in den Rezidivtumoren im Vergleich zu den initialen Tumoren stets niedriger exprimiert wurden.

Zusammengefasst deuten unsere Ergebnisse im Hinblick auf die begrenzte vorhandene Literatur zu diesem Thema darauf hin, dass die Mismatch-Reparatur-Proteine eine bedeutende Rolle bei der Genese und bei der Progression des Glioblastoms spielen.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie wurden weitere Untersuchungen konzipiert. Zum einen soll der Nachweis von MMR-Faktoren auf mRNA-Ebene an schockgefrorenen gepaarten Proben von initialen- und Rezidiv-Glioblastomen erfolgen und mit dem MGMT-Status sowie dem Ansprechen auf die kombinierte Radio-/Chemotherapie mit Temozolomid verglichen werden. Zum anderen sollen immunhistochemische Färbungen an mindestens 200

initialen Glioblastomen durchgeführt werden, um eine multivariate Auswertung im Hinblick auf die prognostische Bedeutung zu ermöglichen. Ein entsprechender Forschungsantrag wurde bereits durch die Familie Mehdorn Stiftung in Kiel bewilligt.

Genetisches *Profiling* kann zum einen das molekulare Verständnis der Tumorentstehung verbessern. Wir können Faktoren benennen, die den Tumor befähigen, die Zellzykluskontrolle zu überwinden, das Zellwachstum hemmende Impulse auszuschalten, ihre Versorgung durch Angiogenese sicherzustellen, in das umliegende Gewebe zu invadieren sowie Fernmetastasen zu bilden [Ng et al, 2011]. Aus diesen Erkenntnissen lassen sich letztlich therapeutische Ansätze entwickeln.

Zum anderen können wir mit Hilfe des genetischen Profils Patientengruppen definieren, die ein höheres oder niedriges Risiko z.B. für Lokalrezidive oder Fernmetastasen aufweisen. Für das Glioblastom sind solche Gruppen in experimentellen Ansätzen bereits in einzelnen Untersuchungen definiert worden [Liang et al, 2005].

Bei anderen Tumoren, z.B. beim Mammakarzinom finden Profiling-Ergebnisse bereits Eingang in die Therapie. Mit dem Verfahren OncotypeDX® der Firma Genomic Health ([www.oncotypedx.com](http://www.oncotypedx.com)) läßt sich anhand von Expressionsanalysen z.B. ein persönliches Risikoprofil für Patientinnen mit nodalnegativem östrogenrezeptorpositivem invasivem Mammakarzinom und postmenopausale Frauen mit nodalpositivem invasivem Mammakarzinom erstellen. Dabei fließen verschiedene Expressionswerte (z.B. Ki67, HER2, Estrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, CyclinB1) in die Ermittlung eines Wertes ein, der das Risiko für das Entstehen einer Fernmetastasierung nach 10 Jahren beschreibt.

Eine ähnliche Vorgehensweise ist auch für das Glioblastom denkbar, wenn es uns gelingt, einige prognostisch wertvolle genetische Faktoren zu finden und deren relative Wertigkeit zu ermitteln. Die Ermittlung der Expression von Mismatch-Reperatur-Genen kann hier ein Baustein sein.

## 5. Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der häufigste und bösartigste hirneigene Tumor des Erwachsenen. Die schlechte Prognose ist vorwiegend durch die regelhaft auftretenden Lokalrezidive bedingt. Genetische Untersuchungen von Rezidiven versus initialen Tumoren erlauben Rückschlüsse auf die Genese und Progression dieser Tumore. Erstaunlicherweise sind derartige Untersuchungen sehr selten.

Das DNA-Mismatch-Repair-System (MMR) ist der wichtigste Mechanismus zur Korrektur von post-Transkriptions- Fehlern in der Erbsubstanz. Defekte im MMR-System spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von malignem Wachstum. Die Bedeutung der MMR-Faktoren wurde ursprünglich anhand des Hereditären Nonpolyposen Kolonkarzinoms (HNPCC) entdeckt. Mittlerweile wurde sie für zahlreiche maligne Tumoren nachgewiesen, u.a. auch für das Glioblastom. Die wichtigsten MMR-Proteine sind MLH1, MSH2 und MSH6. Dabei werden Base/Base Mismatches von dem MSH2-MSH6 Komplex erkannt, worauf die Aktivierung von MLH1 erfolgt. Diese Aktivierung führt zum Abbau des Mismatchproduktes durch Exonucleasen. Die fehlerhafte DNA wird dann korrekt ergänzt.

Das Ziel der hier geschilderten Untersuchungen war es, die DNA-Mismatch-Reparatur-(MMR)-Proteine MLH1, MSH2 und MSH6 bei 42 Glioblastom-Patienten zu bestimmen. Dabei standen jeweils Proben der initialen und der Rezidivtumore aller Patienten zur Verfügung (gepaarte Proben). Die Ergebnisse im initial- und Rezidivtumor wurden untereinander und mit dem Ki67 Proliferationsindex (Ki67 PI) verglichen. Zudem erfolgte eine Überlebensanalyse im Hinblick auf den Proteinexpressionsstatus.

Es wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Tumorproben verwendet. Die immunhistochemischen Färbungen gegen MLH1, MSH2, MSH6 und Ki67 erfolgten mittels spezifischer Antikörper. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test, Wilcoxon Test und LogRank-Test (univariate Überlebensanalyse).

Gemäß den Ergebnissen der hier vorliegenden Untersuchungen ist die Expression von MMR-Proteinen in Glioblastom-Rezidiven folgendermaßen gekennzeichnet:

- Die Expression von MLH1 ist signifikant geringer in Rezidiven (Chi-Quadrat-Test,  $p=0,013$ ; Wilcoxon Test,  $p=0,015$ ).
- Die Expression von MLH1, MSH2 und MSH6 in initialen Tumoren sowie die Expression von MLH1 und MSH2 in Rezidiven war signifikant mit dem Ki67 PI assoziiert (Wilcoxon Test,  $p<0,02$ ).
- Die Expression von MLH1 und MSH6 in initialen Tumoren war signifikant mit dem Überleben der Patienten assoziiert (LogRank Test,  $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ).
- Die Expression von MSH2 und MSH6 war nicht signifikant unterschiedlich in Rezidiven versus initialen Tumoren.

In Zusammenschau mit der spärlich vorhandenen Literatur deuten unsere Ergebnisse auf eine bedeutende Rolle der untersuchten MMR-Proteine für die Genese und für die Progression des Glioblastoms hin. Dabei sind vor allem die Proteine MLH1 und MSH6 interessant, da ihre Expression mit dem Überleben der Patienten assoziiert ist.

Als Konsequenz der hier geschilderten Untersuchungen wurde bereits eine Folgestudie initiiert und erfolgreich Drittmittel eingeworben. Dabei wird der MMR-mRNA-Status in schockgefrorenen Proben untersucht. Ferner wird der MLH1- und MSH6-Protein-Status immunhistochemisch an einer hohen Anzahl initialer Glioblastome untersucht, um eine multivariate Überlebensanalyse zu ermöglichen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Attenello, F.J., Mukherjee, D., Datto, G., McGirt, M.J., Bohan, E., Weingart, J.D., Olivi, A., Quinones-Hinojosa, A., Brem, H. (2008): Use of Gliadel (BCNU) wafer in the surgical treatment of malignant glioma: a 10-year institutional experience. *Ann Surg Oncol*, 10, 2887-93
2. Backes, F.J., Leon, M.E., Ivanov, I., Suarez, A., Frankel, W.L., Hampel, H., Fowler, J.M., Copeland, L.J., O'Malley, D.M., Cohn, D.E. (2009): Prospective evaluation of DNA mismatch repair protein expression in primary endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 114, 486-90
3. Batzdorf, U., Malamud, N. (1963): The problem of multicentric gliomas *J Neurosurg*, 20, 122-36
4. Bello, L., Fava, E., Casaceli, G., Bertani, G., Carrabba, G., Papagno, C., Falini, A., Gaini, S.M. (2009): Intraoperative mapping for tumor resection. *Neurimaging Clin N Am*, 19, 597-614
5. Bertani, G., Fava, E., Casaceli, G., Carrabba, G., Casarotti, A., Papagno, C., Castellano, A., Falini, A., Gaini, S.M., Bello, L. (2009): Intraoperative mapping and monitoring of brain functions for the resection of low-grade gliomas: technical considerations. *Neurosurg Focus*, 27, E4
6. Bonis, P.A., Trikalinos, T.A., Chung, M., Chew, P., Ip, S., DeVine, D.A., Lau, J. (2007): Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: diagnostic strategies and their implications. *Evid Rep Technol Assess*, 150, 1-180
7. Cahill, D.P., Levine, K.K., Betensky, R.A., Codd, P.J., Romany, C.A., Reavie, L.B., Batchelor, T.T., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Curry, W.T., Iafrate, A.J., Louis, D.N. (2007): Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res*, 13, 2038-45
8. Cárdenes, R., Muñoz-Moreno, E., Sarabia-Herrero, R., Rodríguez-Velasco, M., Fuertes-Alija, J.J., Martín-Fernández, M. (2010): Analysis of the pyramidal tract in tumor patients using diffusion tensor imaging. *Neuroimage*, 50, 27-39
9. Ding, X., Mohd, A.B., Huang, Z., Baba, T., Bernardini, M.Q., Lyster, H.K., Berchuck, A., Murphy, S.K., Buermeier, A.B., Devi, G.R. (2009): MLH1 expression sensitises ovarian cancer cells to cell death mediated by XIAP inhibition. *Br J Cancer*, 101, 269-77

10. Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., Herman, J.G. (2000): Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, 343, 1350-4
11. Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, Schackert G, Kreth FW, Pietsch T, Löffler M, Weller M, Reifenberger G, Tonn JC; German Glioma Network. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer*. 2011 Aug 1;129(3):659-70.
12. Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues De Paula A, Fernandez C, Bouvier C. (2008): Histological and molecular classification of gliomas. *Rev Neurol (Paris)*.164, 505-15
13. Filippini G, Falcone C, Boiardi A, Broggi G, Bruzzone MG, Caldiroli D, Farina R, Farinotti M, Fariselli L, Finocchiaro G, Giombini S, Pollo B, Savoiaro M, Solero CL, Valsecchi MG. (2008): Prognostic factors for survival in 676 consecutive patients with newly diagnosed primary glioblastoma. *Neuro Oncol*.10,79-87
14. Gallentine WB, Mikati MA. (2009) Intraoperative electrocorticography and cortical stimulation in children. *J Clin Neurophysiol*. 26, 95-108  
  
Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens AC, Hamou MF, Dietrich PY, Regli L, Janzer RC, Bucher P, Stupp R, de Tribolet N, Domany E, Hegi ME. (2003) Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res.*;63(20):6613-25.
15. Goellner EM, Grimme B, Brown AR, Lin YC, Wang XH, Sugrue KF, Mitchell L, Trivedi RN, Tang JB, Sobol RW. Overcoming temozolomide resistance in glioblastoma via dual inhibition of NAD<sup>+</sup> biosynthesis and base excision repair. *Cancer Res*. 2011 Mar 15;71(6):2308-17.
16. Grossman SA, Reinhard C, Colvin OM, Chasin M, Brundrett R, Tamargo RJ, Brem H. (1992) The intracerebral distribution of BCNU delivered by surgically implanted biodegradable polymers. *J Neurosurg*.76, 640-7



17. Gu L, Cline-Brown B, Zhang F, Qiu L, Li GM. (2002) Mismatch repair deficiency in hematological malignancies with microsatellite instability. *Oncogene*. 21, 5758-64
18. Gupta DK, Chandra PS, Ojha BK, Sharma BS, Mahapatra AK, Mehta VS. (2007): Awake craniotomy versus surgery under general anesthesia for resection of intrinsic lesions of eloquent cortex--a prospective randomised study. *Clin Neurol Neurosurg*. 109, 335-43
19. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 352, 997-1003
20. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. (2008): Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*. 26, 4189-99
21. Hsieh P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. (2001): *Mutat Res*. 486, 71-87
22. Ide T, Kitajima Y, Ohtaka K, Mitsuno M, Nakafusa Y, Miyazaki K. (2008): Expression of the hMLH1 gene is a possible predictor for the clinical response to 5-fluorouracil after a surgical resection in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 19, 1571-6
23. Jiang R, Mircean C, Shmulevich I, Cogdell D, Jia Y, Tabus I, Aldape K, Sawaya R, Bruner JM, Fuller GN, Zhang W. (2006) Pathway alterations during glioma progression revealed by reverse phase protein lysate arrays. *Proteomics*.;6(10):2964-71.
24. Kanamori M, Kon H, Nobukuni T, Nomura S, Sugano K, Mashiyama S, Kumabe T, Yoshimoto T, Meuth M, Sekiya T, Murakami Y. (2000): Microsatellite instability and the PTEN1 gene mutation in a subset of early onset gliomas carrying germline mutation or promoter methylation of the hMLH1 gene. *Oncogene*. 16;19, 1564-71
25. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993): The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*.3, 255-68
26. Kolodner RD, Marsischky GT. (1999): Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev*. 9, 89-96
27. Kombos T, Süß O, Vajkoczy P. (2009): Subcortical mapping and monitoring during insular tumor surgery. *Neurosurg Focus*. 27, E5

28. Kunkel TA, Erie DA. (2005): DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem.* 74, 681-710
29. Leung SY, Chan TL, Chung LP, Chan AS, Fan YW, Hung KN, Kwong WK, Ho JW, Yuen ST. (1998): Microsatellite instability and mutation of DNA mismatch repair genes in gliomas. *Am J Pathol.* 153, 1181-8
30. Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen AW, Aldape KD, Nicholas MK, Lamborn KR, Berger MS, Botstein D, Brown PO, Israel MA. (2005) Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;102(16):5814-9.
31. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6. Review. Erratum in: *Acta Neuropathol* 114, 547
32. Lutterbach J, Sauerbrei W, Guttenberger R (2003): Multivariate analysis of prognostic factors in patients with glioblastoma. *Strahlenther Onkol.* 179, 8-15
33. Martinez R, Schackert HK, Plaschke J, Baretton G, Appelt H, Schackert G. (2004): Molecular mechanisms associated with chromosomal and microsatellite instability in sporadic glioblastoma multiforme. *Oncology.* 66, 395-403
34. Maxwell JA, Johnson SP, McLendon RE, Lister DW, Horne KS, Rasheed A, Quinn JA, Ali-Osman F, Friedman AH, Modrich PL, Bigner DD, Friedman HS (2008): Mismatch repair deficiency does not mediate clinical resistance to temozolomide in malignant glioma. *Clin Cancer Res* 14, 4859-68
35. Mislaw JM, Golby AJ, Black PM. Origins of intraoperative MRI. (2009): *Neurosurg Clin N Am.* 20, 137-46
36. Molinari C, Iorio P, Medri L, Ballardini M, Guiducci G, Cremonini AM, Cerasoli S, Riccioni L, Faedi M, Mariani GA, Zoli W, Silvestrini R, Calistri D. (2010): Chromosome 1p and 19q evaluation in low-grade oligodendrogliomas: a descriptive study. *Int J Mol Med.* 25, 145-51
37. Muir EG, Bell AJ, Barlow KA. (1967) Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with kerato-acanthomata of the face. *Br J Surg.*;54(3):191-5.
38. Nabavi A, Dörner L, Stark AM, Mehdorn HM. (2009): Intraoperative MRI with 1.5 Tesla in neurosurgery. *Neurosurg Clin N Am.* 20, 163-71

39. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL, Miller DC. (1998): Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol.* 8, 655-67
40. Ng K, Kim R, Kesari S, Carter B, Chen CC. (2011) Genomic profiling of glioblastoma: convergence of fundamental biologic tenets and novel insights. *J Neurooncol.* [Epub ahead of print]
41. Olson JJ, Fadul CE, Brat DJ, Mukundan S, Ryken TC.(2009) Management of newly diagnosed glioblastoma: guidelines development, value and application. *J Neurooncol.*; 93(1):1-23.
42. Park DM, Yeane GA, Hamilton RL, Mabold J, Urban N, Appleman L, Flickinger J, Lieberman F, Mintz A. (2009) Identifying Muir-Torre syndrome in a patient with glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol.* ;11(4):452-5.
43. Pepponi R, Marra G, Fuggetta MP, Falcinelli S, Pagani E, Bonmassar E, Jiricny J, D'Atri S. (2003): The effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 304, 661-8
44. Picht T, Mularski S, Kuehn B, Vajkoczy P, Kombos T, Suess O. (2009): Navigated transcranial magnetic stimulation for preoperative functional diagnostics in brain tumor surgery. *Neurosurgery.* 65(6 Suppl):93-8
45. Rellecke P, Kuchelmeister K, Schachenmayr W and Schlegel J. (2004): Mismatch repair protein hMSH2 in primary drug resistance in in vitro human malignant gliomas. *J Neurosurg* 101, 653–658
46. Rich JN, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Rasheed BK, Dobra A, Dressman HK, Bigner DD, Nevins JR, West M. (2005) Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res.*;65(10):4051-8.
47. Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, Kuick R, Blaivas M, Kurnit DM, Taylor J, Hanash SM. (2001) Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res.*;61(18):6885-91.
48. Salvati M, Caroli E, Orlando ER, Frati A, Artizzu S, Ferrante L. (2003) Multicentric glioma: our experience in 25 patients and critical review of the literature. *Neurosurg Rev.* 26, 275-9
49. Scherer HJ. Cerebral astrocytomas and their derivatives (1940): *Am J Cancer* 40:159–98

50. Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, Hagen NA, MacKinnon JA, Sutherland G, Cairncross JG, Forsyth P.(1998) Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. *Can J Neurol Sci.*;25(3):197-201.
51. Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, MacKinnon JA, Hamilton M, Cairncross JG, Forsyth P. (1999) Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study. *Ann Neurol.* ;46(2):183-8.
52. Shukla B, Agarwal S, Suri V, Pathak P, Sharma MC, Gupta D, Sharma BS, Suri A, Halder A, Sarkar C. (2009): Assessment of 1p/19q status by fluorescence in situ hybridization assay: A comparative study in oligodendroglial, mixed oligoastrocytic and astrocytic tumors. *Neurol India.*57, 559-66
53. Stark AM, Nabavi A, Mehdorn HM, Blömer U (2005): Glioblastoma multiforme-report of 267 cases treated at a single institution. *Surg Neurol.* 63, 162-9
54. Stark AM, Witzel P, Strege RJ, Hugo HH, Mehdorn HM. (2003): p53, mdm2, EGFR, and msh2 expression in paired initial and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 74, 779-83  
  
Strege RJ, Godt C, Stark AM, Hugo HH, Mehdorn HM.(2004) Protein expression of Fas, Fas ligand, Bcl-2 and TGFbeta2 and correlation with survival in initial and recurrent human gliomas. *J Neurooncol.*;67(1-2):29-39.
55. Strik H, Deininger M, Streffer J, Grote E, Wickboldt J, Dichgans J, Weller M, Meyermann R. (1999): BCL-2 Family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 67, 763–768
56. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Oppel F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T (2008): ALA-Glioma Study Group. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery.* 62, 564-76
57. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 352, 987–996

58. Szybka M, Bartkowiak J, Zakrzewski K, Polis L, Liberski P, Kordek R. (2003): Microsatellite instability and expression of DNA mismatch repair genes in malignant astrocytic tumors from adult and pediatric patients. *Clin Neuropathol.* 22, 180-6
59. Tieleman A, Vandemaele P, Seurinck R, Deblaere K, Achten E. (2007): Comparison between functional magnetic resonance imaging at 1.5 and 3 Tesla: effect of increased field strength on 4 paradigms used during presurgical work-up. *Invest Radiol.* 42, 130-8
60. Torre D. Multiple sebaceous tumors. (1968) *Arch Dermatol.* ;98(5):549-51.
61. Velasco A, Albert PS, Rosenberg H, Martinez C, Leach FS. (2002): Clinicopathologic implications of hMSH2 gene expression and microsatellite instability in prostate cancer. *Cancer Biol Ther.* 1, 362-7
62. von Ammon K, Roelcke U (1994): Genetic alterations of brain tumors. *J Neurooncol* 22, 245-8
63. Wang L, Bani-Hani A, Montoya DP, Roche PC, Thibodeau SN, Burgart LJ, Roberts LR. (2001): hMLH1 and hMSH2 expression in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 19, 567-70
64. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jääskeläinen J, Ram Z. (2003): A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol.* 5, 79-88
65. Willems PW, van der Sprenkel JW, Tulleken CA, Viergever MA, Taphoorn MJ. (2006) Neuronavigation and surgery of intracerebral tumours. *J Neurol.* 253, 1123-36
66. Wyatt MD, Wilson DM 3rd. (2009): Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci.* 66, 788-99
67. Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL, Louis DN. (2009): MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res.* 15, 4622-9
68. Yoshida T, Kawano N, Oka H, Fujii K, Nakazato Y (2000): Clinical cure of glioblastoma--two case reports. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 40, 224-9
69. Zhang Y, Rohde LH, Wu H. (2009): Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair. *Surg Oncol Clin N Am.* 18, 611-24
70. Ziadi S, Gacem RB, Haoues I, Hachana M, Amara K, Trimeche M, Golli L, Mokni M, Korbi S. (2011) Utility of immunohistochemistry in detecting alterations of mismatch

repair genes of DNA. A series of 48 cases of colorectal cancer. *Ann Biol Clin (Paris)*. ;69(2):167-173.

72. Zuber P, Hamou MF, de Tribolet N. (1988) Identification of proliferating cells in human gliomas using the monoclonal antibody Ki-67. *Neurosurgery*.;22(2):364-8.

## 7. Anhang

**Tabelle 1: Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbung und Überlebenszeit bei 42 Patienten.**

Patienten- identifikation	Geschlecht	Alter	MLH1_i	MLH1_R	MSH2_i	MSH2_R	MSH6_i	MSH6_R	Ki67PI_i	Ki67PI_R	ÜLZ
1	f	61	0,75	0,79	0,86	0,78	0,15	0,03	0,3	0,3	53
2	m	45	0,92	0,58	0,68	0,57	0,38	0,28	0,25	0,4	181
3	f	62	0,48	0,43	0,77	0,67	0,25	0,15	0,3	0,1	268
4	m	54	0,93	0,93	0,76	0,92	0,22	0,33	0,3	0,15	32
5	m	64	0,81	0,65	0,77	0,67	0,52	0,34	0,3	0,2	43
6	f	65	0,77	0,37	0,42	0,77	0,14	0,58	0,3	0,1	61
7	f	68	0,83	0,65	0,85	0,75	0,15	0,15	0,3	0,4	41
8	m	69	0,85	0,45	0,85	0,62	0,22	0,19	0,4	0,4	40
9	m	38	0,82	0,36	0,83	0,66	0,24	0,15	0,4	0,3	110
10	m	42	0,52	0,32	0,73	0,77	0,21	0,11	0,2	0,1	43
11	m	61	0,66	0,92	0,67	0,91	0,27	0,28	0,3	0,3	75
12	f	67	0,81	0,21	0,62	0,72	0,33	0,22	0,3	0,03	50
13	f	59	0,92	0,85	0,83	0,75	0,24	0,16	0,3	0,2	90
14	f	54	0,96	0,68	0,98	0,62	0,22	0,38	0,3	0,1	42
15	f	89	0,93	0,63	0,92	0,76	0,21	0,12	0,5	0,4	101
16	f	35	0,48	0,77	0,63	0,49	0,38	0,02	0,5	0,15	145
17	m	64	0,83	0,57	0,92	0,82	0,29	0,34	0,5	0,3	32
18	f	43	0,52	0,63	0,54	0,64	0,11	0,07	0,3	0,3	96
19	m	67	0,55	0,92	0,63	0,78	0,23	0,23	0,05	0,5	41
20	m	68	0,72	0,55	0,85	0,43	0,13	0,14	0,3	0,3	40
21	m	64	0,29	0	0,93	0,82	0,77	0,73	0,4	0,7	28
22	f	39	0,71	0,69	0,67	0,66	0,26	0,44	0,3	0,3	56
23	m	67	0,79	0,66	0,81	0,82	0,05	0,32	0,3	0,4	53
24	m	62	0,88	0,33	0,78	0,54	0,15	0,03	0,3	0,2	43
25	m	65	0,82	0,66	0,83	0,67	0,15	0,16	0,4	0,2	62

**Legende: f=weiblich; m=männlich; \_i= Expression im initialen Tumor, \_R=Expression im Rezidivtumor, Ki67 PI=Ki67 Proliferationsindex, ÜLZ= Gesamt-Überlebenszeit in Wochen**

**Tabelle 1 (Fortsetzung): Immunhistochemische Färbung und Überlebenszeit  
bei 42 Patienten.**

Patienten- identifikation	Geschlecht	Alter	MLH1_i	MLH1_R	MSH2_i	MSH2_R	MSH6_i	MSH6_R	Ki67PI_i	Ki67PI_R	ÜLZ
26	f	75	0,97	0,93	0,96	0,92	0,28	0,12	0,4	0,05	16
27	m	42	0,38	0,82	0,62	0,77	0,18	0,13	0,2	0,1	145
28	m	73	0,89	0,55	0,83	0,75	0,32	0,15	0,2	0,5	71
29	m	45	0,92	0,91	0,85	0,89	0,12	0,43	0,35	0,3	45
30	m	62	0,77	0,55	0,72	0,54	0,76	0,33	0,2	0,2	42
31	f	60	0,78	0,44	0,59	0,65	0,27	0,15	0,2	0,2	60
32	m	53	0,73	0,68	0,88	0,86	0,18	0,24	0,25	0,4	102
33	m	59	0,77	0,83	0,85	0,77	0,34	0,47	0,4	0,3	58
34	m	55	0,23	0,33	0,54	0,31	0,03	0,28	0,3	0,2	87
35	m	62	0,62	0,82	0,63	0,62	0,29	0,62	0,25	0,4	91
36	m	60	0,78	0,55	0,76	0,92	0,33	0,17	0,2	0,3	73
37	m	68	0,49	0,42	0,35	0,73	0,28	0,12	0,2	0,1	101
38	f	74	0,83	0,82	0,79	0,78	0,24	0,35	0,2	0,1	58
39	f	56	0,55	0,88	0,72	0,82	0,32	0,66	0,2	0,3	96
40	m	41	0,87	0,54	0,86	0,38	0,11	0,03	0,4	0,15	57
41	m	66	0,82	0,93	0,69	0,89	0,05	0,24	0,2	0,3	76
42	f	48	0,79	0,96	0,78	0,97	0,23	0,33	0,5	0,2	52

**Legende: f=weiblich; m=männlich; \_i= Expression im initialen Tumor, \_R=Expression im Rezidivtumor, Ki67 PI=Ki67 Proliferationsindex, ÜLZ= Gesamt-Überlebenszeit in Wochen**



## **8. Lebenslauf**

Name	<b><u>Alexandros Doukas</u></b>
Geburtsjahr	1978
Geburtsort	Athen, Griechenland
Adresse	Adolfstraße 34 24105 Kiel
Telefon-Fax	0431 3858576
Mobiltelefon	015154967834
E-mail	axlpam@googlemail.com

### **Schulbildung**

1984-1990	Grundschule in Athen
1990-1993	
1993-1996	Gymnasium in Athen Lyzeum in Athen , Abschluss mit der Note 18 7/11 (Notensystem in GR: 1-20, sehr gut: 20).

### **Medizinstudium**

10.1996-10.2002	Studium an der Aristoteleio Universität Thessaloniki (Abschluss mit „Sehr gut“). Diplomarbeit 1: Thema „Schilddrüsenkrebs – Chirurgische Therapie“. Diplomarbeit 2: Thema „CIN“.
8.2001-7.2002	Praktikumsjahr: 3 Monate Innere Medizin, 3 Monate Chirurgie, 1 Monat Neurologie, 1 Monat Kinderheilkunde, 1 Monat Frauenheilkunde. .
Juli 1999	Observer in der Abteilung der Gefäß- und Thoraxchirurgie im Allgemeinen Universitätskrankenhaus „Evangelismos“ in Athen. Regelmäßige Teilnahme an Bereitschaftsdiensten der Inneren

1999-2002	Medizin, Chirurgie, Frauenheilkunde, Kinderheilkunde, Neurologie und Kardiologie des "Hippokrateio" Krankenhauses der Universität Thessaloniki
	<b>Approbation als Arzt.</b>
14.11.2002	Einschreibung in der Ärztekammer von Athen
<b><u>Berufserfahrung</u></b>	
5.2.2003-4.5.2003	Dreimonatige Tätigkeit als Assistenzarzt im Allgemeinen Kreiskrankenhaus in Karditsa, GR in den Abteilungen für : Innere Medizin, Chirurgie , Kardiologie.  In dieser Zeit Dienst auf den entsprechenden Stationen, in den Ambulanzen, Bereitschaftsdienst und Betreuung von Notfallpatienten auf ihrem Transport ins Krankenhaus.
5.5.2003-5.9.2004	Ableistung des vierzehnmonatigen pflichtlandärztlichen Dienstes als voll approbierter Arzt im Gesundheitszentrum Sofades in Karditsa, GR. Ärztliche Primärversorgung der ländlichen Bevölkerung, Akut- und Notfallversorgung, ärztliche Betreuung von Notfallpatienten während des Transportes ins Krankenhaus, ärztliche Betreuung von chronisch Kranken, Gesundheitsberatung und medizinische Vorsorge, ärztliche Betreuung schulischer Sportveranstaltungen.  In diesem Rahmen regelmäßige Ableistung von Bereitschaftsdiensten darüber hinaus regelmäßige Teilnahme an  Fortbildungsveranstaltungen zur Schulung des medizinischen Personals des Gesundheitszentrums.
11.11.2004- 29.03.2005	Arzt in der 95. Sanitätsbataillon der Nationalwache im Militärkrankenhaus auf der Insel Rodos, GR
01.12.05-15.03.06	Assistenzarzt in der Allgemeinchirurgie, Kreiskrankenhaus Karditsa, Griechenland
06.04.2006-	Assistenzarzt in der Neurochirurgie, UK-SH, Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn)

**Wehrdienst**

Abgeleiteter Pflichtwehrdienst

9.2004-9.2005

**Sprachkenntnisse**

Griechisch (Muttersprache)

Englisch

Deutsch

## 9. Schriftenverzeichnis

### 9.1. Originalarbeiten (Peer-Review)

1. Petridis AK, Nabavi A, Doukas A, Buhl R, Mehdorn HM (2009). Severe hyponatraemia in the setting of hypopituitarism associated with empty sella and herniation of the optic chiasm and gyrus rectus. J Clin Neurosci.16(5):723-4.

2. Petridis AK, Barth H, Doukas A, Mehdorn HM. (2009) Broken bioceramic used in a computer-assisted reconstruction of the frontal skull bone. J Clin Neurosci.16(8):1089-90.

3. Petridis AK, Dörner L, Doukas A, Eifrig S, Barth H, Mehdorn M. Acute subdural hematoma in the elderly; clinical and CT factors influencing the surgical treatment decision (2009). Cen Eur Neurosurg.70(2):73-8.

4. Petridis AK<sup>1</sup>, Doukas A<sup>1</sup>, Barth H, Mehdorn HM (2009). Spinal cord compression caused by idiopathic intradural arachnoid cysts of the spine: review of the literature and illustrated case. Eur Spine J; 19 Suppl 2:S124-9

#### <sup>1</sup>equal contribution

5. Doukas A, Petridis AK (2009). A case of aplasia of the posterior arch of the atlas mimicking fracture: Review of the literature. Clin Anat.

6. A K Petridis, A Doukas, M Mahvash, L Dörner, H M Mehdorn (2009). A case of rapid growing anaplastic meningiomas. BMJ case reports

7. Stark AM, Doukas A, Hugo HH, Mehdorn HM (2010). The expression of mismatch repair proteins MLH1, MSH2 and MSH6 correlates with the Ki67 proliferation index and survival in patients with recurrent glioblastoma. Neurol. Res (Epub ahead of print)

8. Petridis AK<sup>1</sup>, Doukas A<sup>1</sup>, Barth H, Mehdorn M (2010). Outcome of Craniocerebral Gunshot Injuries in the Civilian Population. Prognostic Factors and Treatment Options. *Cen Eur Neurosurg*.

**<sup>1</sup>equal contribution**

9. Doukas A, Petridis AK, Barth H, Jansen O, Mehdorn HM. Continuous intraarterial infusion of nimodipine at the onset of resistant vasospasm in aneurysmal subarachnoidal haemorrhage. Technical Report.

Angenommen in *Neurological Research*

10. Petridis AK.<sup>1</sup>, DoukasA<sup>1</sup>, Kienke S, Maslehaty H, Mahvash M, Barth H, Mehdorn HM. The effect of lung-protective permissive hypercapnia in intracerebral pressure in patients with subarachnoid haemorrhage and ARDS. A retrospective study.

Angenommen in *Acta Neurochirurgica*

**<sup>1</sup>equal contribution**

## **9.2. Zitierbare Abstracts**

1. Witthiwej T., Doukas A, Dörner L, Nabavi A, Mehdorn HM (2008) High-grade gliomas: Quantitative Comparison between Intraoperative MRI-guided and Fluorescence-guided Resection Congress of neurological surgeons (Poster)

2. Petridis AK, Doukas A, HM Mehdorn and A. Nabavi (2008) A case of encephalomeningocele in a 72 y.o. female patient. Jahrestagung der griechischen neurochirurgischen Gesellschaft (Poster)

3. Doukas A, Nabavi A, Petridis AK, Mehdorn HM (2008) Ten years of spinal tumors; from the laminectomy to the interlaminary approach. Jahrestagung der griechischen neurochirurgischen Gesellschaft (Vortrag)

4. Stark AM, Doukas A, Hugo HH, Mehdorn HM (2009) The expression of mismatch repair proteins MLH1, MSH2 and MSH6 correlates with the Ki67 proliferation index and survival in patients with recurrent glioblastoma. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (Poster)
5. Doukas A, Petridis AK, Barth H, Mehdorn HM (2009) Continuous intraarterial infusion of nimodipine at the onset of resistant vasospasm in aneurysmal subarachnoidal haemorrhage. Jahrestagung der griechischen neurochirurgischen Gesellschaft (Poster)
6. Doukas A, Petridis AK, Barth H, Mehdorn HM (2010) Continuous intraarterial infusion of nimodipine at the onset of resistant vasospasm in aneurysmal subarachnoidal haemorrhage. 5th European-Japanese Joint Conference on Stroke Surgery (Vortrag)
7. Petridis AK, Doukas A, Kienke S, Maslehaty H, Mahvash M, Barth H, Mehdorn HM (2010) The effect of lung-protective permissive hypercapnia in intracerebral pressure in patients with subarachnoid haemorrhage and ARDS. A retrospective study. 5th European-Japanese Joint Conference on Stroke Surgery (Vortrag)

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med H. M. Mehdorn, Direktor der Klinik für Neurochirurgie des UK-SH, Campus Kiel danke ich für die Anregung zur Durchführung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Stark, meinem Doktorvater. Seine kompetente, immer prompte und liebevolle Betreuung hat zu der Erstattung dieser Arbeit maximal beigetragen.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. H.H. Hugo, Leiter des Neuropathologischen Labors der Klinik für die immer nette Unterstützung beim experimentellen Teil dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Tanja Engel, MTA Neuropathologie für die nette Zusammenarbeit bei der Anfertigung der Präparate.

Ich bedanke mich außerdem bei Herrn Dr. med. Petridis, Facharzt für Neurochirurgie, für seine ständige Unterstützung während meiner schwierigen ersten Schritte in der Klinik und im weitem Verlauf.

Ich bedanke mich vielmals bei meinen Eltern, Elena und Konstantinos, für die jahrelange Unterstützung. Sie haben alles hingegeben um mir die beste mögliche Erziehung und Ausbildung zu geben. Ebenfalls danke ich meinem Bruder Nikiforos, für seine Ratschläge jeglicher Art im Laufe meines Lebens.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Frau, Ioanna, die mein Leben liebevoll begleitet trotz der zahlreichen Schwierigkeiten welche in unserem gemeinsamen Lebensweg aufgetaucht sind. Meine Arbeit ist ihr und unserer kleinen Tochter gewidmet.